

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25840017

研究課題名(和文) 動的なオリゴマー形成因子によるWntシグナル伝達制御の構造的基盤

研究課題名(英文) Structural basis of Wnt signaling regulation by dynamic oligomerized proteins

研究代表者

寺脇 慎一 (Terawaki, Shin-ichi)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：10452533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Wntシグナル伝達で特異的に機能する動的オリゴマー形成因子Coiled-coil DIX1(Ccd1)とAxinのDIXドメイン間で形成されるヘテロオリゴマーのX線結晶構造解析に向けた結晶調製法の検討とX線回折データの収集及び構造解析をおこなった。その結果、Ccd1-Axin複合体の結晶のX線回折能を改良することに成功して、分解能3.1オングストロームのX線回折データの収集に成功した。今後、構造決定を進めることで、Ccd1がAxinとヘテロな分子間相互作用を介して、Axinの分子構造を変化させることで細胞内シグナル伝達を制御する仕組みを原子レベルで解明できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The dynamic oligomerized proteins, Coiled-coil DIX1(Ccd1) and Axin, play an important role in the regulation of the Wnt signaling pathway by forming homotypic and heterotypic oligomers between the DIX domains. The structural study for the Ccd1-Axin hetero-oligomer using X-ray crystallography reveals the heterotypic interaction of the Ccd1 DIX domain with the Axin DIX domain and a significance of the hetero-oligomerization in the regulation of the Wnt signaling pathway. This report describes the preparation, crystallization, X-ray diffraction and structural analysis of the Ccd1-Axin hetero-oligomer. The crystals of the Ccd1-Axin hetero-oligomer diffracted to a resolution of 3.1 angstrom. Structural analysis of the Ccd1-Axin hetero-oligomer is now in progress.

研究分野：構造生物化学

キーワード：Wntシグナル伝達 動的オリゴマー形成 X線結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達は、ショウジョウバエからヒトに至る高等生物に保存されており、シグナル伝達経路を構成する蛋白質群の機能異常が、癌や精神性疾患、糖尿病、骨・軟骨疾患において臨床研究から見出されている。Wnt 受容体の膜直下に集積する特異的な蛋白質 Coiled-coil DIX1 (Ccd1)、Axin、Dvl は、DIX ドメインと呼ばれる機能領域を介して、解離・会合を繰り返すホモ及びヘテロな動的オリゴマー形成を介して、下流シグナル経路を制御する Wnt シグナル伝達に特異的な足場蛋白質である。DIX ドメインは、①DIX ドメインがらせん状に連なるホモオリゴマー構造を形成すること、②Wnt シグナル伝達が、下流へのシグナル伝達を制御するために制御因子群を受容体直下に一過的に会合・離散する動的なホモオリゴマーを形成してシグナル伝達を制御する分子機能を持つことが見出されていた (*Nat. Struc. Mol. Biol.*, 2007, 14, 484-492)。

DIX ドメインのホモオリゴマーの形成機構については、生化学的及び構造学的な知見が得られているが、一方で、ヘテロなオリゴマーがどのようにして形成されるのかは明らかにされていない。そこで、ヘテロオリゴマーの形成時における溶液中の挙動変化の分析と X 線結晶構造解析による複合体決定、*in vitro* および *in vivo* 生化学的実験系における検証からの詳細な分子機能の解明が、Wnt シグナル伝達の制御機構を理解するために必要である。

本課題に先立って実施した研究課題(若手研究 B 課題番号 22770112)において、精製タンパク質を用いた結合実験によって、Ccd1 と Axin が DIX ドメインを介して結合することを確認していた。また、Ccd1-Axin ヘテロオリゴマーの結晶化に成功して、放射光施設における X 線回折実験からおよそ 20 Å の低分解能の回折点を確認していた。

2. 研究の目的

本研究では、Wnt シグナル依存的に解離・会合を繰り返して動的なオリゴマーを形成する DIX ドメインが、ヘテロな分子間相互作用によってホモオリゴマー構造を変化させてシグナル伝達を制御する仕組みを解明する。Ccd1 と Axin は、DIX ドメインを含む領域を介してヘテロオリゴマーをつくることで、シグナル伝達の活性化に働く。本研究では、Ccd1 と Axin の DIX ドメインで形成されるヘテロオリゴマーの X 線結晶構造解析をおこない、DIX ドメインのヘテロ分子間相互作用を原子レベルで解明する。そして、Axin DIX ドメインの単独オリゴマー構造と複合体中での構造比較をおこない、Axin の分子構造の変化とシグナル伝達制御との関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Ccd1 と Axin の DIX ドメインをそれぞれ大腸菌で発現させて、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。精製した試料は、混合してヘテロオリゴマーを形成させた。Ccd1-Axin ヘテロオリゴマー結晶の X 線回折能を向上させることを目的として、結晶化に用いる Axin の DIX ドメイン領域について複数の断片領域を調製し、結晶化に適した試料調製を試みた。そして、ヘテロオリゴマー形成後に陰イオン交換クロマトグラフィーを実施して精製純度を向上させた。さらに、ホルムアルデヒドを用いたアルキル化後、ボラン-ジメチルアミン錯体を用いて還元反応をおこないリジン残基のメチル化修飾をおこなった。リジン残基のメチル化修飾効率は、質量分析によって確認した。また、マウスとゼブラフィッシュの Ccd1 DIX ドメインが形成するホモオリゴマーの X 線結晶構造解析をそれぞれおこなったところ、Ccd1 DIX ドメインは、ホモオリゴマー形成を阻害する特異な分子機能があることが明らかとなり、自己ホモオリゴマー形成阻害を解消する変異体を作成して、結晶化をおこなった。

Ccd1-Axin ヘテロオリゴマーは蒸気拡散法によって結晶化させて、SDS-PAGE による組成分析をおこなった。得られた結晶は、放射光施設 Photon Factory で窒素気流中における極低温下で X 線回折実験をおこない、X 線回折能を評価して、良質なものについては X 線回折データの収集を行なった。

4. 研究成果

Axin の DIX ドメインについて、N 末端側の開始残基が異なる複数の断片領域を用いて Ccd1 DIX ドメインとの結晶化をおこなったところ、N 末端領域を含む断片領域では結晶化せず、X 線回折実験には至らなかった。そこで、これまでに得ていた Ccd1-Axin ヘテロオリゴマーの結晶化試料について、精製純度を向上させ、さらに、リジン残基のメチル化修飾をおこなったところ、調製した結晶の X 線回折能は、分解能 9 Å 程度まで向上した。

また、マウスとゼブラフィッシュの Ccd1 DIX ドメインのホモオリゴマーについても X 線結晶構造解析を進めたところ、マウス Ccd1 (mCcd1) では、二重らせん型のホモオリゴマー構造が結晶中で形成されていた。一方で、ゼブラフィッシュ Ccd1 (zCcd1) は、Axin DIX ドメインのホモオリゴマーに類似した 1 本鎖型のホモオリゴマー構造を形成しており、mCcd1 DIX ドメインとのアミノ酸配列の相同性が高いにも関わらず異なっていることが確認された。両者をそれぞれ培養細胞に発現させると、mCcd1 では、Wnt シグナル伝達経路に対する活性は弱いが、一方で、zCcd1 の活性化能は高いことが報告されている。したがって、mCcd1 は、二

重らせん型のオリゴマー構造形成に伴って、自身の分子活性を抑制する可能性が考えられた。そこで、立体構造に基づいて、mCcd1の二重らせん形成に関わるアミノ酸残基の変異体を作成して、Wnt シグナル伝達活性を測定したところ、mCcd1 変異体は、zCcd1 と類似したレベルの活性を示した。また、DIX ドメインの精製試料を用いて動的散乱測定をおこなったところ、mCcd1 DIX ドメインのホモオリゴマー形成能は、zCcd1 と比較すると弱い、二重らせん形成に関わるアミノ酸残基の点変異体は、ホモオリゴマー形成に対する親和性が、zCcd1 と同等の親和性を示すことがわかった。以上の結果は、mCcd1 が、Wnt シグナル伝達の制御において、ホモオリゴマー形成を自己阻害する分子状態を持つことを示唆している。

上記で明らかにした mCcd1 の自己阻害能は、Ccd1-Axin ヘテロオリゴマーの結晶化にも影響している可能性が考えられた。そこで、mCcd1 DIX ドメインの自己阻害を解消した点変異体と Axin DIX ドメインとの相互作用をプルダウンアッセイで検討したところ、mCcd1 の自己阻害状態の解消は、Axin との相互作用を促進することがわかった。さらに、mCcd1 自己阻害解消点変異体と Axin とのヘテロオリゴマーを結晶化して、X 線回折実験を行なったところ、分解能 3.1 Å までの X 線回折データの収集に成功した。mCcd1 と Axin の DIX ドメインの単量体構造をサーチモデルとした分子置換法による構造解析において、結晶中における分子位置の決定に成功して、現在、構造モデルの精密化をおこなっている。今後、構造解析を進めて、Ccd1 と Axin とのヘテロオリゴマーを形成する分子間相互作用を明らかにすることによって、Ccd1 がどのように Axin のホモオリゴマー構造を変化させて、Axin 機能を制御することで Wnt シグナル伝達経路を活性化するかを原子レベルで解明することができるかと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. S. Terawaki, H. Ootsuka, Y. Higuchi, and K. Wakamatsu, Crystallographic characterization of the C-terminal coiled-coil region of mouse Bicaudal-D1 (BICD1), *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 70, 1103-1106 (2014). (査読有)
2. H. Wang, K. Hosoda, S. Terawaki, and K. Wakamatsu, Refolding additive, dimethylbenzylammonium propane sulfonate (NDSB-256), accelerates Gly-Pro cis-trans Isomerization. *Protein Pept. Lett.* 22, 234-238 (2014). (査読有)
3. S. Terawaki, A. Yoshikane, Y. Higuchi, and K. Wakamatsu, Structural basis for cargo binding and autoinhibition of Bicaudal-D1 by a parallel coiled-coil with homotypic registry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 451-456 (2015). (査読有)
4. S. Terawaki, R. Matsubayashi, K. Hara, T. Onozuka, T. Kohno, and K. Wakamatsu, Biochemical characterization of a heterotrimeric Gi-protein activator peptide designed from the junction between the intracellular third loop and sixth transmembrane helix in the m4 muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 64-69 (2015). (査読有)
5. S. Terawaki, K. Kitano, M. Aoyama, T. Mori, and T. Hakoshima, MT1-MMP recognition by ERM proteins and its implication in CD44 shedding. *Genes Cells*, 20, 847-859 (2015). (査読有)
6. H. Wang, K. Hosoda, T. Ishii, R. Arai, T. Kohno, S. Terawaki and K. Wakamatsu, Protein stabilizer, NDSB-195, enhances the dynamics of the $\beta 4$ - $\alpha 2$ -loop of ubiquitin. *J. Peptide. Sci.*, 22, 174-180 (2016). (査読有)
7. 寺脇慎一、サリドマイド誘導体がもたらすユビキチンリガーゼ基質認識の変換機構、*ファルマシア*、Vol. 52、12、1157、2016 (査読無)

[学会発表] (計 30 件)

1. 寺脇慎一、大塚寛貴、樋口芳樹、若松馨、逆行性輸送因子による積荷認識の構造的基盤、物質構造科学研究所サイエンスフェスタ、平成 25 年 3 月 筑波
2. 大槻 竜太郎、角 優樹、荒井 諒、出村 哲朗、中沢 和磨、真井 隆徳、手塚 福栄、吉澤 光彦、王海梅、石井 毅、寺脇 慎一、若松 馨、タンパク質安定化剤スルホベタインが各種分子間・分子内相互作用に及ぼす効果、日本蛋白質科学会年会、平成 25 年 6 月鳥取
3. 寺脇慎一、北野健、青山美紀、箱嶋敏雄、膜貫通型プロテアーゼ MT1-MMP の ERM 蛋白質による細胞骨格連結の構造的基盤、日本蛋白質科学会年会、平成 25 年 6 月鳥取
4. N. Shibata, T. Katsutani, S. Terawaki, H. Yamamoto, A. Kikuchi, and Y. Higuchi, Structure of the native Axin-DIX domain crystallized without mercury compound. 7th International Conference on Structural Genomics, Aug. 2013, Sapporo
5. S. Terawaki, K. Kitano, M. Aoyama, T. Hakoshima, Crystal structure of the

- radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of membrane type1-matrix metalloproteinase, 7th International Conference on Structural Genomics, Aug. 2013, Sapporo
6. 勝谷拓也、柴田直樹、寺脇慎一、山本英樹、菊池章、樋口芳樹、水銀化合物存在下での野生型 Axin DIX ドメインの構造解析、日本結晶学会年会、平成 25 年 10 月 熊本
 7. 寺脇慎一、北野健、森智行、青山美樹、箱嶋敏雄、Radixin と MT1-MMP との複合体の X 線結晶構造解析、日本結晶学会年会、平成 25 年 10 月 熊本
 8. 松林里奈、寺脇慎一、若松馨、G タンパク質共役型受容体による三量体 G タンパク質の活性化機構に関する構造生物学的研究、日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、平成 25 年 12 月 高崎
 9. 原加奈子、松林里奈、寺脇慎一、若松馨 m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の第 6 膜貫通ヘリックスペプチドと G タンパク質との相互作用の変異体解析、日本生化学会関東支部例会、平成 26 年 6 月 茨城
 10. 山井俊英、神山亮司、寺脇慎一、武田茂樹、若松馨、可溶化した G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の Non-Detergent SulfoBetaine (NDSB) による安定化、日本生化学会関東支部例会、平成 26 年 6 月 茨城
 11. 寺脇慎一、大塚寛貴、樋口芳樹、若松馨、逆行性輸送因子による積荷認識の構造的基盤、日本蛋白質科学会年会、平成 26 年 6 月 横浜
 12. 山井俊英、石井毅、高橋怜羅、中島正人、山下直樹、寺脇慎一、武田茂樹、若松馨、小さい疎水基を有するスルホベタインによる GPCR の熱安定化、日本蛋白質科学会年会、平成 26 年 6 月 横浜
 13. S. Terawaki, K. Kitano, T. Mori, Y. Higuchi, N. Itoh, T. Watanabe, K. Kaibuchi and T. Hakoshima, Structural Basis for the membrane-targeting of Rac-specific guanine nucleotide exchange factors, Tiam1/2, 6th Special Neurochemistry Conference, International Society for Neurochemistry, Sep. 2014, Tokyo, Japan.
 14. 原加奈子、松林里奈、寺脇慎一、河野俊之、若松馨、m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内第 3 ループ/第 6 膜貫通ヘリックスペプチドと $G\alpha_{i1}$ との相互作用解析、日本生化学会大会、平成 26 年 10 月 京都
 15. 寺脇慎一、大塚寛貴、樋口芳樹、若松馨、逆行性輸送制御因子 BICD1 の C 末端コイルドコイル領域の X 線結晶構造解析、日本結晶学会年会、平成 26 年 11 月 東京
 16. 荒井諒、原加奈子、寺脇慎一、若松馨、m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞質内第 3 ループペプチドと $G\alpha_{i1}$ との結合解析、日本化学会関東支部群馬地区懇談会、平成 26 年 12 月 桐生
 17. 大槻 竜太郎、石井 毅、寺脇慎一、若松馨、タンパク質安定化剤スルホベタインがタンパク質の凝集防止及び各種分子間相互作用に及ぼす効果、日本化学会関東支部群馬地区懇談会、平成 26 年 12 月 桐生
 18. 池田裕貴、寺脇慎一、若松馨、膜貫通型プロテアーゼ MT1-MMP と β カテニンとの複合体の結晶化、日本化学会関東支部群馬地区懇談会、平成 26 年 12 月 桐生
 19. 藤田祥平、寺脇慎一、塩見健輔、榊和子、榊正幸、若松馨、柴田直樹、樋口芳樹、ゼブラフィッシュ Coiled-Coil DIX1 の DIX ドメインの X 線結晶構造解析、物質構造科学研究所シンポジウム、平成 27 年 3 月 筑波
 20. 神山亮司、山井俊英、王海梅、細田和男、寺脇慎一、武田茂樹、若松馨、Non-Detergent SulfoBetaine がタンパク質に及ぼす効果、第 42 回生体分子討論会、平成 27 年 6 月 高崎
 21. 神山亮司、山井俊英、寺脇慎一、武田茂樹、若松馨、可溶化した M2 muscarinic acetylcholine receptor の Non-Detergent SulfoBetaine による安定化、日本生化学会関東支部例会、平成 27 年 6 月 新潟
 22. 小野塚樹、寺脇慎一、河野俊之、若松馨、m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内第 3 ループ/第 6 膜貫通ヘリックスペプチドと G タンパク質との複合体の調整と生化学的解析、日本生化学会関東支部例会、平成 27 年 6 月 新潟
 23. 吉兼明日香、寺脇慎一、大塚寛貴、樋口芳樹、若松馨、逆行性輸送因子 Bicaudal-D1 の積荷認識と自己機能制御に必須なアミノ酸残基の同定、日本生化学会関東支部例会、平成 27 年 6 月 新潟
 24. 吉兼明日香、寺脇慎一、樋口芳樹、若松馨、逆行性輸送因子 Bicaudal-D1 の積荷認識と自己機能制御に関する構造学的解析、日本蛋白質科学会、平成 27 年 6 月 徳島
 25. A. Yoshikane, S. Terawaki, Y. Higuchi and K. Wakamatsu, Structural basis for cargo binding and autoinhibition of retrograde transport adaptor Bicaudal D1, *The Japanese Society of Neurochemistry*, Sep 2015, Saitam, Japan

26. 山西勲平, 柴田直樹, 寺脇慎一, 樋口芳樹, Wnt/ β カテニンシグナル経路で働くDIXドメイン複合体の構造解析、日本結晶学会年会、平成27年10月 大阪
27. 藤田祥平、寺脇慎一、塩見健輔、梶和子、梶正幸、柴田直樹、樋口芳樹、若松馨、ゼブラフィッシュゼブラフィッシュ Ccd1 DIX ドメインの結晶構造が示唆する新規なWntシグナル伝達制御、日本結晶学会年会、平成27年10月 大阪
28. 藤田祥平、寺脇慎一、塩見健輔、梶和子、梶正幸、若松馨、柴田直樹、樋口芳樹、Wntシグナル伝達制御因子CCD1のDIXドメインを介する新規な自己活性制御の構造基盤、日本生化学会大会、平成27年12月 神戸
29. S. Terawaki, Structural basis of Wnt signaling regulation by dynamic polymerized proteins, *The 13th Conference of the Asian Crystallographic Association*, Dec. 2015, India
30. S. Fujita, S. Terawaki, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, N. Shibata, Y. Higuchi and K. Wakamatsu. X-ray crystallographic characterization of the signaling proteins mediating neuronal development. *2th International Symposium of Gunma University Medical innovation*. Dec. 2015, Gunma Japan.

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://wakamatsu-lab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/Wakamatsu-lab/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺脇慎一 (TERAWAKI Shin-ichi)
群馬大学 大学院理工学府・助教
研究者番号：104525533

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし